

DOI: 10.16306/j.1008-861x.2022.05.011

# 七龙天干预博来霉素模型小鼠肺纤维化的作用机制研究

张强<sup>1</sup>, 罗婷<sup>2</sup>, 袁德政<sup>3</sup>, 付义<sup>4</sup>, 袁嘉丽<sup>1,2</sup>

1. 上海中医药大学基础医学院(上海 201203); 2. 云南中医药大学基础医学院(云南 昆明 650500); 3. 云南中医药大学临床医学院(云南 昆明 650500); 4. 昆明市中医医院肺病科(云南 昆明 650500)

**【摘要】**目的: 观察七龙天对博来霉素致小鼠肺纤维化的干预作用及可能的作用机制。方法: 将 36 只 C57BL/6J 小鼠随机分为空白组、模型组、七龙天低、中、高剂量组、吡非尼酮组。建立小鼠肺纤维化模型后, 空白组和模型组以 0.9% NaCl 溶液灌胃, 七龙天组和吡非尼酮组分别以七龙天和吡非尼酮灌胃。给药 21 d 后, 采用 HE 染色和 Masson 染色检测小鼠肺组织形态和胶原沉积情况, 碱水解法检测羟脯氨酸(HYP)含量, qRT-PCR 法检测 *TGF-β*、*α-SMA*、*COL-I*、*COL-III*、*TNF-α*、*CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* mRNA 表达水平, Western blot、免疫荧光双标法检测 *TGF-β*、*α-SMA*、*COL-I*、*COL-III*、*TNF-α*、*IL-17R*、*p38MAPK*、*p-p38MAPK* 蛋白表达水平, 并对空白组和模型组小鼠肺组织进行转录组测序。结果: ①与空白组比较, 模型组小鼠肺组织呈现炎症细胞浸润和肺泡间隙扩大现象, 胶原沉积较多( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 发现七龙天各剂量组可抑制炎症细胞浸润和肺泡间隙扩大, 且吡非尼酮组和七龙天各剂量组肺部胶原沉积明显减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。②与空白组比较, 模型组的 HYP 含量升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 吡非尼酮组、七龙天各剂量组的 HYP 含量均降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。③与空白组比较, 模型组 *COL-I*、*COL-III*、*α-SMA*、*TGF-β*、*TNF-α* 的蛋白和 mRNA 表达水平升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 吡非尼酮组和七龙天各剂量组的 *COL-I*、*COL-III*、*α-SMA*、*TGF-β*、*TNF-α* 蛋白和 mRNA 表达水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。④通过对空白组和模型组小鼠肺组织的转录组测序分析可知, 差异基因显著富集于 *IL-17/p38MAPK* 信号通路。⑤与空白组比较, 模型组 *CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* mRNA 和 *IL-17R*、*p-p38MAPK* 蛋白表达水平升高( $P<0.01$ ); 与模型组比较, 吡非尼酮组和七龙天各剂量组的 *CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* mRNA 和 *IL-17R*、*p-p38MAPK* 蛋白表达水平降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。同时, 七龙天对上述 mRNA 和蛋白表达的影响呈剂量依赖性, 其中高剂量的作用更有效。结论: 七龙天可以通过下调炎症与胶原基因和蛋白的表达, 减轻肺部炎症反应, 降低肺部胶原过度沉积, 发挥干预肺纤维化的作用, 其作用机制可能为通过抑制 *IL-17/p38MAPK* 信号通路发挥作用。

**【关键词】** 七龙天; 肺纤维化; 转录组; *IL-17/p38MAPK*

## Mechanism study of Qilongtian on pulmonary fibrosis in bleomycin model mice

ZHANG Qiang<sup>1</sup>, LUO Ting<sup>2</sup>, YUAN Dezheng<sup>3</sup>, FU Yi<sup>4</sup>, YUAN Jiali<sup>1,2</sup>

1. School of Basic Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. School Of Basic Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China; 3. School of Clinical Medicine, Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China; 4. Department of Pulmonary Diseases, Kunming Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650500, Yunnan, China

[基金项目] 云南省科技中医联合重点项目[2017FF117(-007)]; 云南省中医药学分子生物学重点实验室(云南中医药大学)建设项目(2019DG016)

[作者简介] 张强, 女, 在读博士生, 主要从事中西医结合防治重大疾病的基础研究

[通信作者] 袁嘉丽, 教授, 博士生导师; E-mail: 2748132800@qq.com

收稿日期: 2022-04-19; 修回日期: 2022-07-03

**ABSTRACT Objective:** To observe the intervention effect and possible mechanism of Qilongtian on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice. **Methods:** Thirty-six C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group, Qilongtian low, medium and high dose group, pirfenidone group. After the establishment of mouse pulmonary fibrosis model, the control group and model group were administrated with 0.9% NaCl solution by gavage, and the Qilongtian group and pirfenidone group were administrated with Qilongtian and pirfenidone by gavage respectively. After 21 d of administration, the morphology and collagen deposition of mice lung were measured by HE and Masson staining. The content of hydroxyproline (HYP) was detected by alkali hydrolysis method. The expression levels of *TGF-β*,  $\alpha$ -SMA, *COL- I*, *COL- III*, *TNF-α*, *CCL2*, *FOSL1*, *MMP9*, *CXCL5*, *AREG* mRNA were detected by qRT-PCR. The expression levels of *TGF-β*,  $\alpha$ -SMA, *COL- I*, *COL- III*, *TNF-α*, IL-17R, p38MAPK, and p-p38MAPK protein were detected by Western blot and immunofluorescence double labeling method. **Results:** ① Compared with the control group, the lung tissues of mice in model group showed inflammatory cell infiltration and alveolar space expansion, and the collagen deposition was more ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, Qilongtian each dose group inhibit the infiltration of inflammatory cells and the expansion of alveolar space, and collagen deposition was significantly reduced in pirfenidone group and Qilongtian each dose group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). ② Compared with the control group, the content of HYP in the model group increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the content of HYP in pirfenidone group and Qilongtian each dose group decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). ③ Compared with the control group, the protein and mRNA expression level of *COL- I*, *COL- III*,  $\alpha$ -SMA, *TGF-β*, *TNF-α* in the model group increased ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the protein and mRNA expression levels of *COL- I*, *COL- III*,  $\alpha$ -SMA, *TGF-β*, *TNF-α* in pirfenidone group and Qilongtian each dose group decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). ④ Transcriptome sequencing analysis of mice lung tissues in the blank group and model group showed that differential genes were significantly enriched in IL-17/p38MAPK signaling pathway. ⑤ Compared with the control group, the expression levels of *CCL2*, *FOSL1*, *MMP9*, *CXCL5*, *AREG* mRNA and IL-17R, p-p38MAPK protein increased in the model group ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the expression levels of *CCL2*, *FOSL1*, *MMP9*, *CXCL5*, *AREG* mRNA and IL-17R, p-p38MAPK protein decreased in pirfenidone group and Qilongtian each dose group ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Meanwhile, the effects of Qilongtian on the above mRNA and protein expression were dose-dependent, and high dose was more effective. **Conclusion:** Qilongtian can intervene pulmonary fibrosis by down regulating the expression of inflammation, collagen genes and proteins, alleviate pulmonary inflammatory response, reducing excessive deposition of pulmonary collagen, and its mechanism may be through inhibition of IL-17/p38MAPK signal pathway.

**KEYWORDS** Qilongtian; pulmonary fibrosis; transcriptome; IL-17/p38MAPK

《2019 新型冠状病毒肺炎呼吸康复指导意见》显示,新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的重型/危重型出院患者胸部 CT 的检查多显示出肺纤维化(pulmonary fibrosis, PF)改变,并且此改变可能持续存在。PF 是一种病因不明的慢性、进行性、异质性的以纤维化改变为特征的瘢痕性疾病<sup>[1-2]</sup>。PF 的主要病理特点是早期以下呼吸道急性炎症反应为主,并伴随着大量成纤维细胞病理性增生转型,导致后期某些细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分在肺泡和间质内沉积,纤维组织过度修复造成肺组织结构的紊乱、肺泡损伤、胶原沉积,最终导致 PF<sup>[3-7]</sup>。西医治疗 PF 主要采用抗纤维化阶段性药物(吡非尼酮、尼达尼布)等,上述药物均存在不同程度的毒副作用且价格昂贵,会影响患者的生活质量并增加患者的经济负担。七龙天为云南省医疗机构制剂,是云南省中医药学会肺系病专委会主任委员、青年岐黄学者付义教授的临床经验用方。近年来付义教授在门诊和住院部常用七龙天治疗 PF,其可延缓 PF 的进程,改善患者肺功能,提高患者生存质量<sup>[8]</sup>。白介素-17(interleukin-17, IL-17)与受体结合后,可通过活化 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38

mitogen activated protein kinase, p38MAPK)发挥其生物学活性<sup>[9]</sup>。因此,本研究选取了 IL-17/p38MAPK 信号途径,评价七龙天干预博来霉素致小鼠 PF 模型,观察其可能的抗纤维化机制,为七龙天治疗 PF 提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,4 周龄,体质量(20±2)g,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产许可证号为 SCXK(川)2020-030。动物饲养于云南中医药大学动物房,实验动物使用许可证号为 SYXK(滇)K2013-0007,饲养温度(22±3)℃,12 h 明暗交替。所有动物实验遵守云南大学动物伦理实验委员会的指导方针,并通过了云南中医药大学动物伦理委员会的审批(伦理编号:R-06202023)。

1.1.2 药物与试剂 七龙天胶囊[货号:滇药制字(Z)2020003A],由昆明市中医医院提供,配方为三七 6 g、地龙 15 g、红景天 30 g。

吡非尼酮(批准文号:国药准字 H20133316),北京康蒂尼药业有限公司;注射用盐酸博来霉素(批准文号:国药准字 H20055883),杭州瀚晖制药有限公司;羟脯氨酸(HYP)测定试剂盒(货号:A030-2-1),南京建成生物工程研究所;通用型组织固定液(货号:G1101-500ML)、RIPA 裂解液(货号:G2002-100ML)、 $\beta$ -actin 抗体(货号:GB12001),武汉赛维尔生物科技有限公司;BCA 试剂盒(货号:P0010),上海碧云天生物技术有限公司。qRT-PCR 试剂:Hifair® III 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(gDNA digester plus)逆转录预混液(货号:H2010081)、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix (Low Rox Plus) PCR 预混液(货号:11202ES08),上海 YEASEN 公司。肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )抗体(货号:ab215188)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )抗体(货号:ab215715)、I 型胶原蛋白(collagen-I, COL-I)抗体(货号:ab260043)、III 型胶原蛋白(collagen-III, COL-III)抗体(货号:ab283694)、IL-17 受体(IL-17R)抗体(货号:ab180904)、p-p38MAPK 抗体(货号:AF4001),美国 Affinity Biosciences 公司;FITC 标记山羊抗兔 IgG(货号:BL033A)、FITC 标记山羊抗小鼠 IgG(货号:BL031A),合肥 Biosharp 公司。

1.1.3 主要仪器 5417R 型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;Synergy 型酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;QuantStudio 5 型实时荧光定量 PCR 仪,美国 Applied Biosystems 公司;PowerPac Basic 型电泳仪、Criterion Cell 型电泳槽、Mini Trans-Blot 型转印槽,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 分组与造模 用随机数字表法将 36 只小鼠随机分为空白组、模型组、吡非尼酮组和七龙天低、中、高剂量组,每组 6 只。小鼠常规饲料喂食,自由饮水,适应性喂养 1 周。小鼠以气管内插管单次注入博来霉素(5 mg/kg)的方式造模<sup>[10]</sup>;各组小鼠称重后,用 10% 水合氯醛按 4 g/kg 腹腔注射麻醉,小鼠呼吸平稳无明显喘息后倾斜 30°,固定。头颈分界线部位剪毛,皮肤消毒备皮,用小镊子轻轻提起小鼠裸露皮肤,纵向切开 0.5 cm,慢慢钝性分离肌肉暴露气管,空白组小鼠采用 1 ml 注射器取 0.05 ml 0.9% NaCl 溶液注入气管,其余各组小鼠气管内注射 0.05 ml 博来霉素溶液。拔出针头后,立即将小鼠板直立,左右悬转约 30 s 后呈 30°缝合颈部皮肤。将小鼠轻轻放入鼠笼,呈倾斜状态放置。

1.3 干预与取样 干预剂量与干预方式:参考《药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算》<sup>[11]</sup>,七龙天低、中、高剂量组小鼠分别以 0.039、0.078、0.156 g/kg 的药物与 0.9% NaCl 溶液的混合液灌胃,吡非尼酮组小鼠以 0.001 5 g/kg 灌胃。造模 14 d 后开始给药,1 次/d,连续给药 21 d。给药结束后,禁食不禁水 12 h,取小鼠右肺中叶,放入组织固定液中固定,常温保存,用于苏木精-伊红(HE)和 Masson 染色;取小鼠左肺,置于-80 °C 冻存,用于分子实验。

#### 1.4 检测指标与方法

1.4.1 HE 染色 采用石蜡切片脱蜡,苏木素染色,伊红染色,脱水封片。将切片晾干,中性树胶封片,显微镜下观察并拍照,分析结果。

1.4.2 Masson 染色 石蜡切片脱蜡至水,重铬酸钾染色,铁苏木素染色,丽春红酸性品红染色,磷钼酸处理,苯胺蓝染色,冰醋酸分化,用中性树胶进行封片,显微镜下观察并拍照,分析结果。

1.4.3 HYP 含量测定 按照 HYP 测定试剂盒操作说明进行检测,记录光密度(OD),计算 HYP 含量,计算公式:HYP 含量( $\mu\text{g/ml}$ )=(OD<sub>样品</sub>-OD<sub>空白</sub>)/(OD<sub>标准品</sub>-OD<sub>空白</sub>) $\times$ 标准品浓度 $\times$ (水解液总体积/组织湿重)。

1.4.4 转录组测序 提取小鼠肺组织 RNA,检测 RNA 的完整性:检测吸光度比值,范围在 1.8~2.0 则可以使用。收集具有完整性的 RNA 进行建库,并建立相应的 RNA 文本数据库,RNA 委托上海麦特绘谱生物科技有限公司进行检测,采用高通量测序并提高阈值进行筛选,获得高质量的测序数据,将测序序列与数据库进行比对,获得转录本,利用 7 大数据库 [Ensembl、GO (Gene Ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)、EC (Encyclopedia)、EggNOG、UniProtAC、Entrez\_geneID] 对转录本数据进行基因注释;分析和计算基因表达量并进行统计;采用多种算法标准化处理数据后,进行差异基因分析,并进行统计学处理,以  $P < 0.05$  且  $FC > 1.2$  为主要的差异比较标准,获得转录组测序数据的差异基因;采用 KEGG 数据库进行分析,确定差异基因富集的信号通路。

1.4.5 qRT-PCR 实验 本试验选取 TGF- $\beta$ 、 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、COL-I、COL-III、TNF- $\alpha$ 、趋化因子配体 2(C-C motif chemokine ligand2, CCL2)、转录因子 1(Fos-like antigen 1, FOSL1)、

基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase-9, MMP9)、CXC趋化因子配体5(C-X-C motif chemokine ligand 5, CXCL5)、双向调节素(amphiregulin, AREG)基因,以 $\beta$ -actin作为内参,应用NCBI选取C57BL/6J小鼠中的基因序列设计PCR引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表1。称量组织30 mg,按照逆转录试剂说明进行样本RNA逆转录,按照qPCR试剂说明进行qPCR实验。扩增程序:95 °C, 5 min; 95 °C, 10 s; 60 °C, 30 s, 40个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的相对表达量。

表1 引物序列

基因名称	引物序列
TGF- $\beta$	上游:5'-AGCAACAATTCCTGGCGATACCTC-3' 下游:5'-TCAACCACTGCCGACAACCTC-3'
TNF- $\alpha$	上游:5'-CAGGCGGTGCCTATGTCTC-3' 下游:5'-CGATCACCCGAAGTTCAGTAG-3'
COL-I	上游:5'-GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3' 下游:5'-CCACGTCTCACCATTGGGG-3'
COL-III	上游:5'-TGCTGCTGCTACTCCTGGTCTG-3' 下游:5'-ACCTGGACCGCCTGGTTCAC-3'
$\alpha$ -SMA	上游:5'-TGCTGACTCTGGAGATGGTGTG-3' 下游:5'-CGGCAGTAGTCACGAAGGAATAGC-3'
CCL2	上游:5'-TCATAGCTACCACCATCAGTCCTCAG-3' 下游:5'-CTGGCTGCTTGTGATTCTCCTGTAG-3'
FOSL1	上游:5'-ACCACACCCTCCCTAACTCCTTTTC-3' 下游:5'-TGCTGCTGCTACTCTTGCGATG-3'
MMP9	上游:5'-GGACTAGCCAGGAGGGAGAACAG-3' 下游:5'-GCCAGTGAGTGAAGGGACAGAAC-3'
CXCL5	上游:5'-TGCGTTGTGTTTGTCTTAACCGTAAAC-3' 下游:5'-TGACTTCCACCGTAGGGCACTG-3'
AREG	上游:5'-CACTACAGGCTCCGAGATGAACAAC-3' 下游:5'-TGTCGTGCTTGGTTCTCCTGTGAC-3'
$\beta$ -actin	上游:5'-CTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3' 下游:5'-GCAATGCCTGGGTACATGCTGG-3'

1.4.6 免疫荧光双标法 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复后画圈并加入血清封闭,加入一抗,切片平放于湿盒内4 °C孵育过夜,加入二抗,室温孵育50 min。切片稍甩干后在圈内滴加DAPI染液,避光室温孵育10 min,自发荧光淬灭5 min,流水冲洗10 min,封片,镜检拍照。DAPI染色的细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素标记的红色、绿色。

1.4.7 Western blot法 小鼠肺组织采用RIPA裂解液均质化,浓度用BCA法测定。SDS-聚丙烯酰胺

凝胶电泳分离总蛋白。电泳后将蛋白转移到PVDF膜。加入一抗(1:1 000),4 °C孵育过夜。次日取膜,以TBST溶液洗涤后加入山羊抗兔或抗小鼠IgG(1:1 000),室温孵育1 h,再用TBST洗膜。在膜表面滴加ECL(A:B=1:1)发光液,置于化学发光成像系统显影,曝光时间30~90 s,采用CFX Manager 2.1软件进行分析。

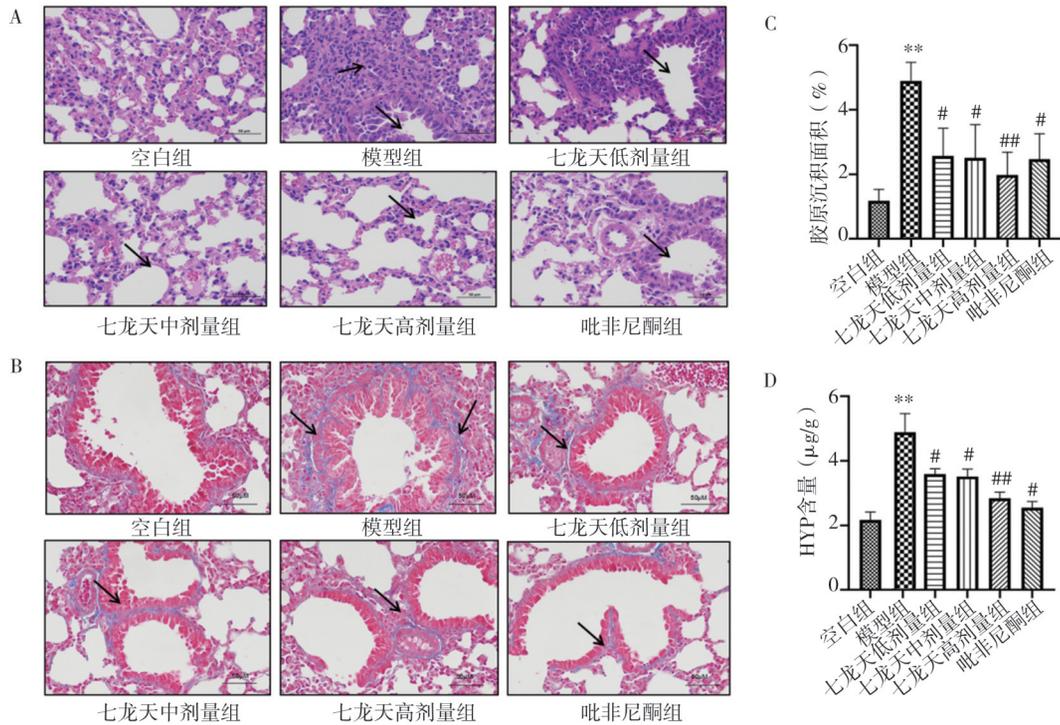
1.5 统计学方法 实验数据采用Graphpad Prism 10.0软件统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。样本符合正态分布并且方差齐性时,采用单因素方差分析和组间比较。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 对小鼠肺组织形态及胶原沉积的影响 与空白组比较,模型组呈现炎症细胞浸润和肺泡间隙扩大现象;与模型组比较,七龙天低、中、高剂量组可抑制炎症细胞浸润和肺泡间隙扩大,见图1A。与空白组比较,模型组胶原沉积较多( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组肺部胶原沉积明显减少( $P < 0.05$ ),七龙天低、中、高剂量组胶原沉积呈剂量依赖性减少( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见图1B、C。与空白组比较,模型组的HYP含量明显升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组和七龙天低、中、高剂量组的HYP含量均明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),见图1D。

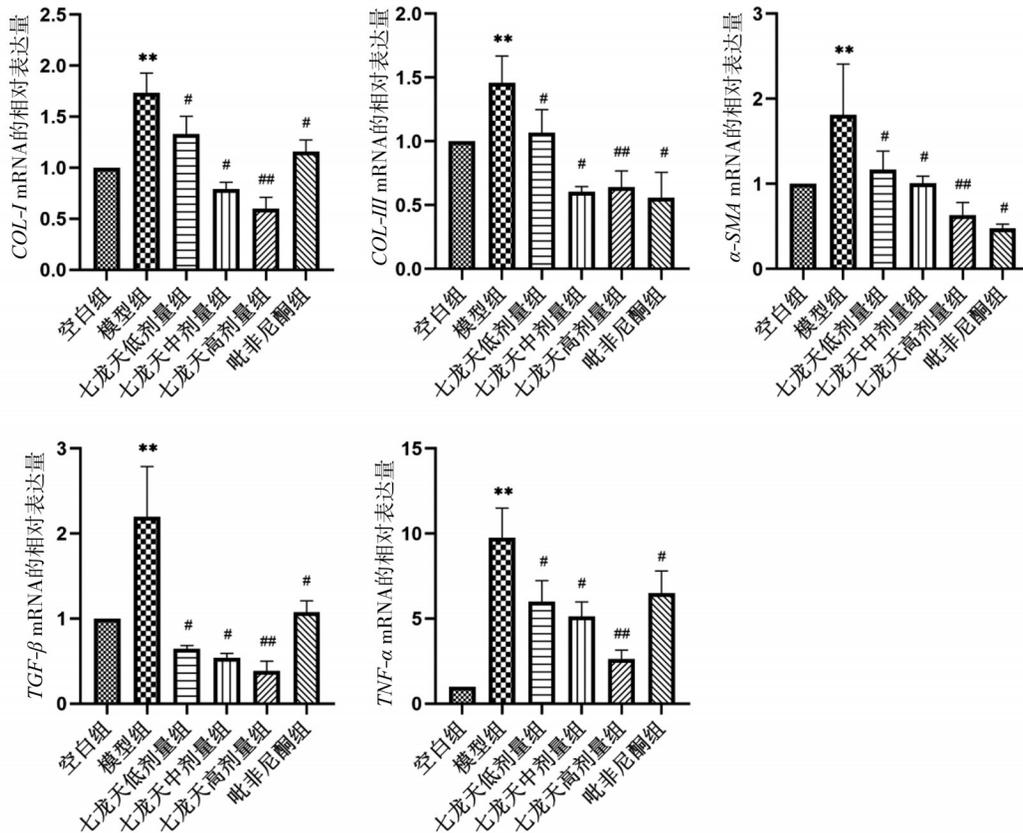
2.2 对小鼠肺组织中炎症和胶原相关指标mRNA表达水平的影响 与空白组比较,模型组COL-I、COL-III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA水平升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组和七龙天低、中、高剂量组的COL-I、COL-III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  mRNA水平降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且七龙天对上述mRNA表达的影响呈剂量依赖性,其中高剂量的作用更有效。结果表明,七龙天能降低PF小鼠肺组织中炎症和胶原相关指标mRNA表达水平。见图2。

2.3 对小鼠肺组织中炎症和胶原相关指标蛋白表达水平的影响 与空白组比较,模型组COL-I、COL-III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的蛋白表达升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,吡非尼酮组和七龙天低、中、高剂量组的COL-I、COL-III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 蛋白表达水平降低( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且七龙天对上述蛋白表达的影响呈剂量依赖性,其中高剂量组的作用更有效。见图3、图4。



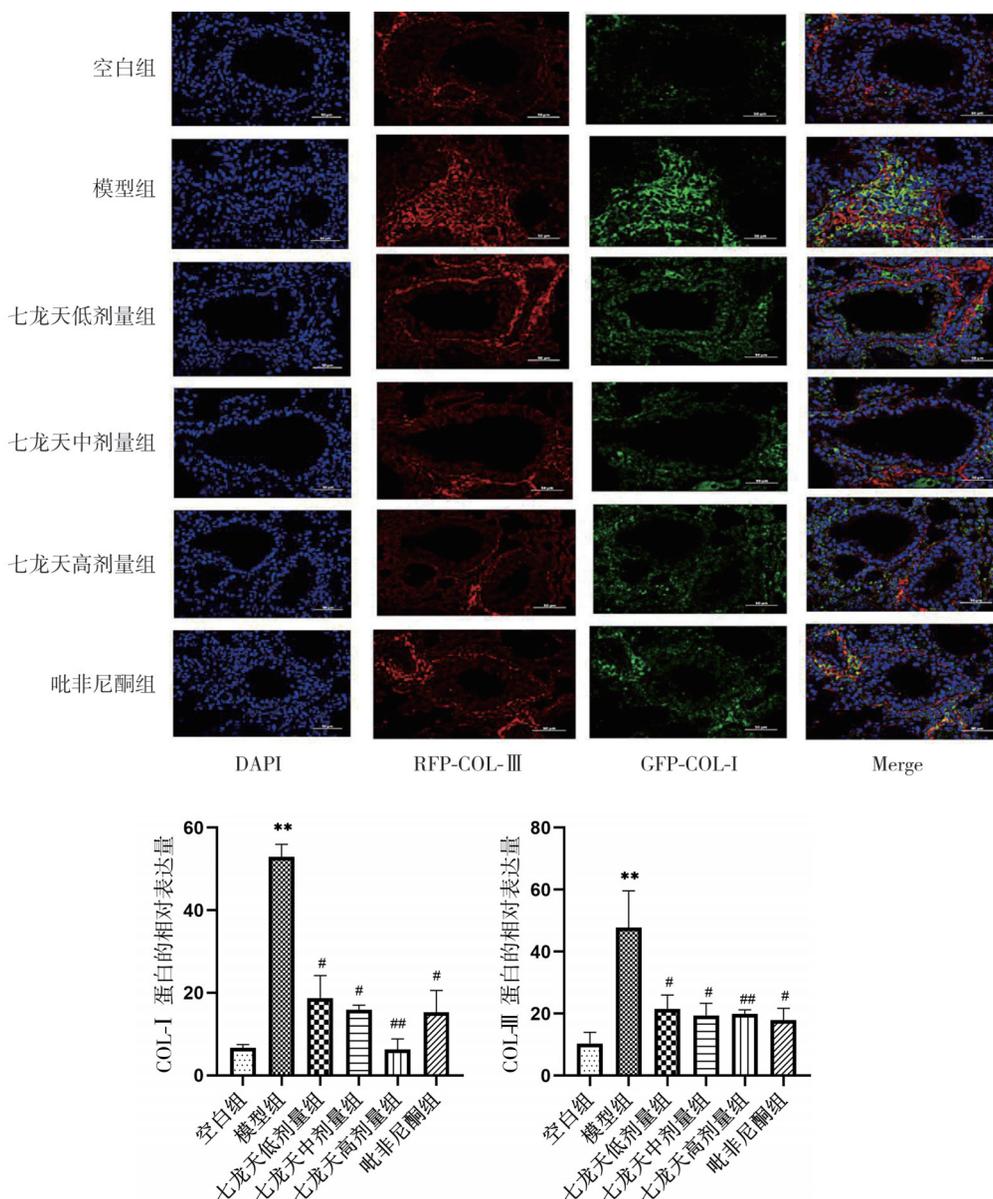
A 为 HE 染色( $\times 400$ );B 为 Masson 染色( $\times 400$ );C 为胶原沉积面积百分比;D 为肺组织 HYP 含量。与空白组比较,\*\* $P < 0.01$  ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

图 1 各组小鼠肺组织形态学、胶原沉积面积和 HYP 含量( $n=3, \bar{x} \pm s$ )



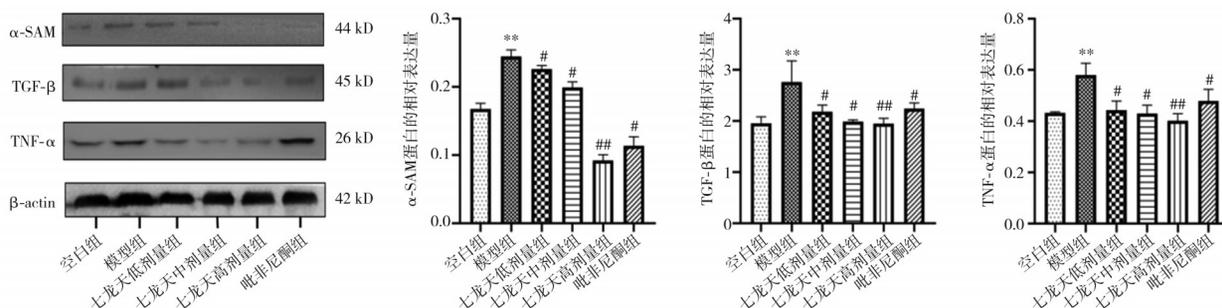
与空白组比较,\*\* $P < 0.01$  ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

图 2 各组小鼠肺组织 COL-1、COL-III、α-SMA、TGF-β、TNF-α mRNA 表达( $n=3, \bar{x} \pm s$ )



与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

图3 免疫荧光法检测各组小鼠肺组织 COL-I、COL-III、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白表达( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

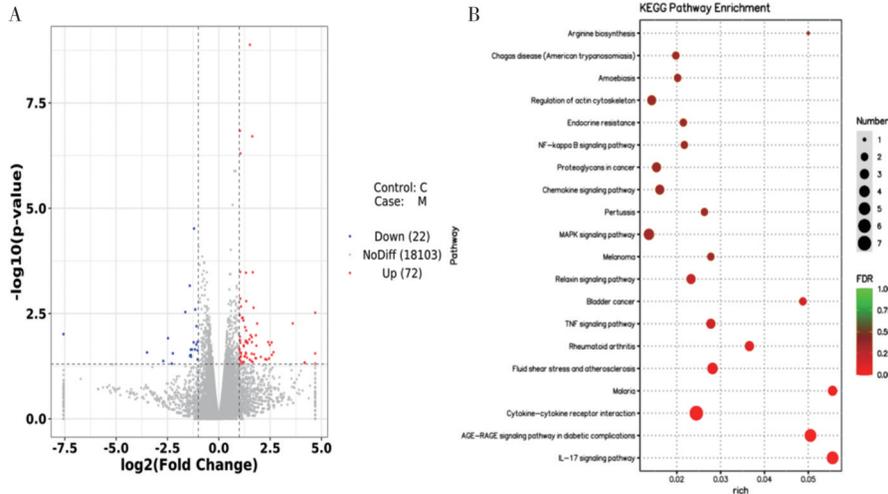


与空白组比较,\*\* $P<0.01$ ;与模型组比较,# $P<0.05$ ,## $P<0.01$

图4 Western blot 法检测各组小鼠肺组织  $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$  蛋白的表达( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

2.4 转录组测序筛选相关信号通路 通过对空白组和模型组肺组织的转录组测序分析可知,两组数据比较后共获得 94 个有意义的基因。通过 KEGG 功能分

析,发现差异基因显著富集于 IL-17/p38MAPK 信号通路。见图 5。



A 为肺组织 PM2.5 差异基因的 Volcano-plot 分布;B 为肺组织差异基因的 KEGG 富集分析气泡图

图 5 小鼠肺组织转录组测序结果(n=3, x̄±s)

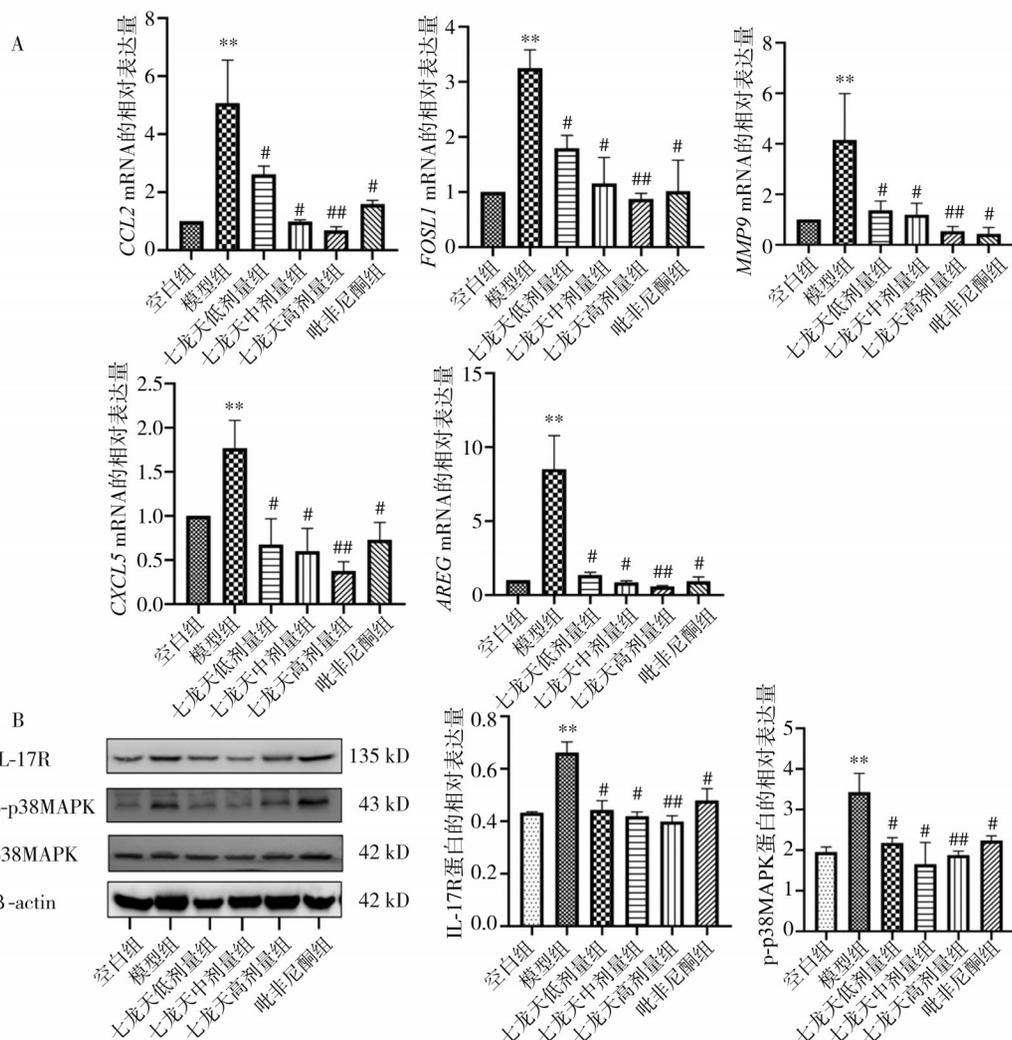
2.5 基于 IL-17/p38MAPK 信号通路干预 PF 小鼠炎症和胶原沉积 与空白组比较,模型组 CCL2、FOSL1、MMP9、CXCL5、AREG mRNA 和 IL-17R、p-p38MAPK 蛋白表达水平升高(P<0.01);与模型组比较,吡非尼酮组和七龙天低、中、高剂量组的 CCL2、FOSL1、MMP9、CXCL5、AREG mRNA 和 IL-17R、p-p38MAPK 蛋白表达水平降低(P<0.05, P<0.01),且七龙天对上述 mRNA 和蛋白表达的影响呈剂量依赖性,其中高剂量的作用更有效。见图 6。

炎症因子可反复介导肺泡细胞损伤及修复,导致 PF 发生<sup>[15]</sup>。TGF-β 升高除了能促进 ECM 形成,还会诱导成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,而肌成纤维细胞能特异性表达 α-SMA,促进 ECM 的沉积,故可以通过观察 α-SMA 的表达来判断 PF 形成情况,此外肌成纤维细胞分泌的 COL- I、COL- III 也能促进 ECM 沉积,加快 PF 进展<sup>[16-17]</sup>。本研究检测了纤维化相关因子的表达,结果显示七龙天给药组可显著降低模型组小鼠肺组织中 COL- I、COL- III、TGF-β、α-SMA、TNF-α 蛋白和 mRNA 的表达水平(P<0.05)。说明七龙天能抑制促纤维化因子 TGF-β、α-SMA、TNF-α 的活化,降低肺部炎症反应,减少胶原蛋白沉积,从而达到延缓 PF 的作用。

### 3 讨论

PF 的主要病理特点是纤维组织过度修复造成肺组织结构的紊乱、肺泡损伤、胶原沉积,最终引起 PF<sup>[3,12]</sup>。由于炎性细胞的积聚和细胞因子的释放可使胶原纤维增加,导致肺组织重塑及肺泡数量减少、变形、闭锁和肺功能丧失,该过程为 PF 的主要病理变化过程<sup>[13-14]</sup>。在本研究中,病理切片结果显示,PF 模型组的肺组织中有大量炎性细胞浸润,肺泡间隙增宽,并有大量的胶原纤维浸润,同时作为胶原沉积主要成分之一的 HYP 表达水平显著升高。七龙天干预后,小鼠肺组织得到修复,HYP 的表达水平显著降低,表明七龙天可减少胶原沉积并能抑制 HYP 的表达。上述结果表明,七龙天能够修复 PF 的病理改变。

转录组测序是对特定细胞在某一功能状态下所能转录出来的所有 RNA 的总和进行高通量测序<sup>[18]</sup>。本研究通过空白组和模型组小鼠肺组织转录组的高通量测序,探究其造成损害的相关机制,通过转录组测序,找出差异表达基因,并对这些基因进行 GO 功能和 KEGG 信号通路富集分析,发现这些差异表达基因参与了机体的多种生物学过程,尤其是免疫系统的调节、信号途径的调控及细胞增殖与凋亡的调节。通过对排在首位的 IL-17 信号通路富集基因的文献研究表明,巨噬细胞和上皮细胞产生的 CCL2 趋化因子为促纤维化介质,CCL2 能促进纤维化的发展<sup>[19]</sup>。FOSL1 基因参与调控多种细



A 为肺组织 *CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* mRNA 表达;B 为肺组织 IL-17R 和 p-p38MAPK 蛋白表达。与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

图6 各组小鼠肺组织 *CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* mRNA 和 IL-17R、p-p38MAPK 蛋白表达( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

细胞的增殖、凋亡和迁移等生物学行为,和炎症信号通路密切相关<sup>[20]</sup>。CXCL5 是 CXC 类趋化因子家族中的一员,由多种细胞产生,具有很强的粒细胞趋化作用,CXCL5 作为炎性环境的重要成分,它的升高在肿瘤发生、侵袭、转移及进展中发挥重要作用<sup>[21]</sup>。成纤维细胞生长因子 23 (fibroblast growth factor-23,FGF23)作为重要的调磷因子,其过表达可显示成纤维细胞繁殖与分化的活性增强<sup>[22]</sup>。AREG 由单核-巨噬细胞分泌,常伴随 TGF- $\beta$  产生,AREG 能促进 *COL-I* 和 *COL-III* mRNA 的表达,能够通过抑制胶原酶的活性从而对 ECM 成分堆积产生影响,并能介导纤维降解<sup>[23]</sup>。IL-17 是 T 细胞诱导的炎症反应的早期启动因子,可以通过促进前炎性细胞因子的释放来放大炎症反应。IL-17 与 IL-17 R

结合后,可通过 MAPK 途径发挥其生物学作用,从而有效地介导组织细胞的炎症反应<sup>[8-9]</sup>。IL-17 信号通路明显活化时,可活化蛋白激酶 p38MAPK 信号通路,p38MAPK 明显活化时,进而介导转录因子活化,参与肺纤维细胞的增殖与分化<sup>[24]</sup>。本研究中,KEGG 富集分析结果表明 IL-17/p38MAPK 信号途径在其中起着重要作用,且七龙天干预后其富集基因 *CCL2*、*FOSL1*、*MMP9*、*CXCL5*、*AREG* 及 IL-17R 和 p-p38MAPK 蛋白表达水平明显降低,表明七龙天可能通过调控 IL-17/p38MAPK 信号通路中相关基因的表达,降低细胞的炎症反应,减少胶原沉积,缓解 PF 的进程。

综上所述,七龙天具有多靶点抗 PF 的作用,能显著降低 PF 小鼠肺组织的炎症损伤、HYP 含量和

胶原沉积,并下调 PF 小鼠肺组织中炎症和纤维化相关因子的 mRNA 和蛋白表达,其作用机制可能与 IL-17/p38MAPK 信号通路有关。本研究揭示了七龙天缓解 PF 的潜在作用机制,为临床预防和治疗 PF 提供了新的思路和方法。

#### 参考文献:

- [1] GUZY R D, LI L, SMITH C, et al. Pulmonary fibrosis requires cellautonomous mesenchymal fibroblast growth factor (FGF) signaling[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(25): 10364-10378.
- [2] 杨春妙,张洪春,刘冬. 益气养阴通络法治疗特发性肺纤维化的系统评价[J]. *中日友好医院学报*, 2021, 35(3): 172-174.
- [3] 郭闪闪,于宁霞,张一,等. 特发性肺纤维化的研究进展[J]. *中国民间疗法*, 2020, 28(3): 97-100.
- [4] HU X, SHEN H, WANG Y, et al. Liver X receptor agonist TO901317 attenuates paraquat-induced acute lung injury through inhibition of NF- $\kappa$ B and JNK/p38 p38MAPK signal pathways [J]. *Biomed Res Int*, 2017, 49(4): 693-699.
- [5] LI F Z, CAI P C, SONG I J, et al. Crosstalk between cal-pain activation and TGF- $\beta$ 1 augments collagen-I synthesis in pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(9): 1796-1804.
- [6] 武洁,杨晓君,王晶,等. TGF- $\beta$ /Smads 信号通路对 PM2.5 致大鼠肺组织损伤的免疫调控作用[J]. *西北药学杂志*, 2017, 32(3): 316-321.
- [7] CHEN X, LI C, LIU J, et al. Inhibition of ER stress by targeting the IRE1 $\alpha$ -TXNDC5 pathway alleviates crystalline silica-induced pulmonary fibrosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 95: 107519.
- [8] 张平云,付义,杨春艳. 云药七龙天治疗肺胀探析[J]. *河南中医*, 2020, 40(12): 1828-1830.
- [9] 李蓉,姚血明,宁乔怡,等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞 IL-17/IL-17R 的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2018, 29(5): 546-551.
- [10] 贾晓峰,郭新彪. 改进型快速小鼠气管滴注法——透射灯下经口直视滴注法研究[J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(3): 217-219.
- [11] 黄继汉,黄晓晖,陈志扬,等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [12] GRAMLEY F, LORENZEN J, KOELLENSPERGER E, et al. Atrial fibrosis and atrial fibrillation: the role of the TGF-beta1 signaling pathway[J]. *Int J Cardiol*, 2010, 143: 405-413.
- [13] NAKERAKANTI S, TROJANOWSKA M. The Role of TGF- $\beta$  Receptors in Fibrosis[J]. *Open Rheumatol J*, 2012, 6: 156-162.
- [14] MILTON P L, DICKINSON H, JENKIN G, et al. Assessment of respiratory physiology of C57BL/6 mice following bleomycin administration using barometric plethysmography[J]. *Respiration*, 2012, 83(3): 253-266.
- [15] 杨伟煌,董焕远. N-乙酰半胱氨酸联合糖皮质激素治疗 COPD 并肺间质纤维化的临床疗效分析[J]. *华夏医学*, 2019, 32(3): 23-25.
- [16] LIU X, LONG X, LIU W, et al. Type I collagen induces mesenchymal cell differentiation into myofibroblasts through YAP-induced TGF- $\beta$ 1 activation [J]. *Biochimie*, 2018, 150(2): 110-130.
- [17] HUANG C Y, HSIEH Y L, JU D T, et al. Attenuation of magnesium sulfate on CoCl<sub>2</sub>-induced cell death by activating ERK1/2/MAPK and inhibiting HIF-1 $\alpha$  mitochondrial apoptotic signaling suppression in a neuronal cell line [J]. *Chin J Physiol*, 2015, 58(4): 244-253.
- [18] KHORRAMDELAZAD M, BAR I, WHATMORE P, et al. Transcriptome profiling of lentil (*Lens culinaris*) through the first 24 hours of *Ascochyta lentis* infection reveals key defence response genes [J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 108.
- [19] POPIOLEK B K, CIECHANOWSKA A, KATARZYNA C, et al. The CCL2/CCL7/CCL2/CCR2 pathway is substantially and persistently upregulated in mice after traumatic brain injury, and CCL2 modulates the complement system in microglia [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2020, 54: 101671.
- [20] SHETTY A, BHOSALE S D, TRIPATHI S K, et al. Interactome Networks of FOSL1 and FOSL2 in Human Th17 Cells [J]. *ACS omega*, 2021, 6(38): 24834-24847.
- [21] CHANG T T, LIAO LY, CHEN J W. Inhibition on CXCL5 reduces aortic matrix metalloproteinase 9 expression and protects against acute aortic dissection [J]. *Vascul Pharmacol.*, 2021, 141: 106926.
- [22] WEI X, HUANG X, LIU N, et al. Understanding the Stony Bridge between Osteoporosis and Vascular Calcification: Impact of the FGF23/Klotho axis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 7536614.
- [23] ARRIOLA BENITEZ P C, PESCE VIGLIETTI A I, GOMES M T R, et al. *Brucella abortus* Infection Elicited Hepatic Stellate Cell-Mediated Fibrosis Through Inflammasome-Dependent AREG Production[J]. *Front Immunol*, 2020, 21(10): 3036.
- [24] ZHANG X F, XIANG S Y, LU J, et al. Electroacupuncture inhibits IL-17/IL-17R and post-receptor MAPK signaling pathways in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Acupunct Med*, 2021, 39(6): 662-672.

(编辑:杨轶舜)